PRODUCTION OF CYTIDINE BY FERMENTATION

Patent Number:

JP3228689

Publication date:

1991-10-09

Inventor(s):

FURUYA KAORU

Applicant(s)::

ASAHI CHEM IND CO LTD

Requested Patent:

□ JP3228689

Application Number: JP19900025574 19900205

Priority Number(s):

IPC Classification:

C12P19/38

EC Classification:

Equivalents:

JP2938497B2

Abstract

PURPOSE:To enable mass-production of cytidine by transforming a specific microorganism with a recombinant DNA containing a cytidine triphosphate synthetase(CTP synthetase) gene and culturing the transformant.

CONSTITUTION: Bacillus natto C-1 strain (A) capable of producing cytidine and having the following bacteriological properties is separated from soil. The shape and size of the cell, bacillus, (0.7-1.0)X(2-8) mum; Gram-positive; reducing nitric acid salt; hydrolyzing starch; etc. The cell of the strain A is extracted and cloned to obtain a CTP synthetase gene (B). The component B is introduced into a vector and the strain A is transformed with the resultant recombinant DNA (C) (e.g. plasmid pFS037) to obtain a recombinant (D). Cytidine is produced by inoculating the strain D on a medium containing glucose, tetracycline, etc., and culturing at about 37 deg.C for about 3 days.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

◎ 公開特許公報(A) 平3-228689

@Int. Cl. 5

識別記号

疔内整理番号

⑩公開 平成3年(1991)10月9日

C 12 P 19/38 # C 12 N 1/21 15/32 (C 12 P 19/38 C 12 R 1:07) 8214-4B 7236-4B

8717-4B C 12 N 15/00 審査請求 未請求 請求項の数 1

A (全8頁)

❷発明の名称

発酵法によるシチジンの製造方法

②特 題 平2-25574

愈出 頭 平2(1990)2月5日

砂発明 者 印出 類 人

古家 加夫留

静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

Ø代 理 人 弁理士 获上 登規

蜗 柳 名

1.発料の名称

発酵法によるシチジンの製造方法

2.特許請求の範囲

シチジン生産能を有する微生物をCTPシンセターで遺伝子を含む組換体DNAで形質転換し、 得られる形質転換体を増養して指要物中にシチジンを生成蓄積させ、該培養物からシチジンを採取することを特徴とするシチジンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシチジンの発酵法による製造方法に関する。より詳しくは、本発明は、シチジン生産能を有する微生物の形質転換体を使用するシチジンの多量生産方法に関する。

【従来技術】

機生物を培養してシチジンを得る方法として は、パチルス・ズブチリス重いはプロテウス・レ トゲリーの変異株を用いる方法(特公昭36-21459 号公録): プレビバクテリウム属のプリン、ビリミジン及びヒスチジンに対してアナログ耐性の変異体を用いる方法(特公昭57-18871号公報); ミクロバクテリウム側のプリンに対してアナログ創性の変異体を用いる方法(特公昭57-18872号公報): バチルス無のビリミジンに対してアナログ 耐性の変異体を削いる方法(特際昭61-135597 号公額)等が始られている。

ところで微生物体内におけるシチジンが合成されるに至る代謝経路においては、ウリジンス系合物のウラシル場塞部分がアミノ化されてシチジン系化合物が生成され、ほシチジン系化合物のウリン酸(以下、ロTPという。)のアPという。)が生じる反応が唯一の経路である。この解析はシチジン三リン酸合う。)が生じる存在が唯一の経路である。この解析して、ウェンセクーゼという。)であるでは、ウェーを連続して、ウェークを開発して、クロアンでは、カラによるフィークの関係を含まること、発現量が増地のシチンの関係を含まること、発現量が増地のシチンの関係を含まること、発現量が増地のシチンのであること、発現量が増加めること、発現量が増加めること、発現量が増加めてあること、発現量が増加めてあること、発現量が増加めてあること、発現量が増加めてあることを表現量が増加めて

ジン量で抑制されること等、その活性は緩密に調 節されている。また、この酵素の遺伝子のクロー ニングについて、太陽菌由来のCTPシンセター ぜ遺伝子 [Journal of Biological Chemistry 261 .5568 (1986)] 、パチルス・ズブチリス由来 のCTPシンセターせ遺伝子 (Journal of Bacteriology 174. 4194-4298 (1986)) の報告がある。

しかしながら、上記クローニングの報告はいずれもCTPシンセターゼ遺伝平の産業上の利用を目的としたものではなく、同酵素遺伝予を做生物を用いて高度に発現させたりしたものでもなく、自つまたそれを利用してシチジンの工業的生産を倉閣したものでもない。

し発明の目的)

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシ チジンの発酵法により多量生産できる方法を提供 することにある。

本発明の他の目的は、ランダムな変異にのみ頼っていた従来のシテジン生度酸に代えて、細順之手法により得られた甚シテジン生産機を有するシ

いる脚生物でもよいし、天然或いは人工の変異によって、シチジン生産能が付与された関生物でもよい。このような微生物としては、パチルス・ズブチリス或いはプロテウス・レトグリーの 変異様、プレビバクテリウム展細菌から誘導されたブリンアナログまたはヒスチジンアナログ耐性株、ミクロバクテリウム属細菌から誘導されたプリンアナログ副性株、パチルス・ナットクで一1株(微工研修等第11055号)学が挙げられる。

上記のパチルス・ナットウC-1は、土壌から 新しく分類されたシチジン生産能を有する調であ り、その哲学的性状は下記の通りである。

- (a) 形態字的形状
- a) 細胞の形および大きさ:短律額、∮.1~1.0 × 2~6 u
- 2) 多形生:単一まれに二進
- 3) 運動性:なし
- 4] 総子:卵型の内生総子を栄養細胞の中央付近 に生じる

チジン生産適を使用してシチジンの発酵法による 多量生産方法を提供することにある。

【発明の構成・効果】

本発明者は、シチジン系化合物の含成系の各種 酵素群の中でも特にCTPシンセターゼに着目 し、この酵素活性を強化することがシチジン生産 量の上昇に寄与すると考え、クローニングした CTPシンセターゼ退伝子をシチジン生産圏に組 み込み高度に発現させることによって、CTPシ ンセターゼの発現意が増加し、さらにシチジンの 生産艦が展離的に増加することを見い出し、 薬知 見に基づき本発明を完成するに至った。

即ち、本鬼朝は、シチジン生産能を有する微生物をCTPシンセターゼ遺伝子も含む超級体DNAで形質転換し、得られる形質転換体を増進して培養物中にシチジンを生成蓄積をせ、該塔養物からシチジンを採取することを特徴とするシチジンの製造方法にある。

本発明において使用するシチジン生産能を省する数生物としては、元来シチジン生産能を有して

- 5) グラム染色:陽性
- 6) 抗酵性:陰性
- (b) 生質状況
- i) 向汁果天培養:灰白色で周辺が製開状の属平なコロニーを作る。
- 2) 肉汁液体培養:表面に皮唇を作るが、他は通 験
- (c) 生理的性質
- 1) 硝酸塩の遺元:有り
- 2) クエン酸の利用:有り
- 3) プロピオン蟹の利用:なし
- 4) VPテスト: 陽性
- 5] デンブンの加水分解:再り
- 6] カゼインの加水分解:有り
- 71 オキシダーゼ:貴翁
- 8) カタラーゼ:有り
- 9) インドールの生成:なし
- 10/ 酸素に対する態度: 好気性
- Ti) ピオチン要求性:有り
- 12) 1.5 %グルタミン酸を含む培地で粘性物質の

生成:有り

13) シチジンの培地への排出:有り

なお、このパチルス・ナットクCー1は、平成元年10月19日付で、通問艦院省工業技術院競生物工業技術研究所に、微工研胞寄第11055号(FERM P-11055)の寄託費号で寄託してある。

シチジンを生盛する能力のある微生物より C T P シンセターゼ遺伝子をクローニングする方法としては以下の方法を用いて取得することができる。

- (1) シチジン生産能を有する機生物の遺伝子を発現させることが可能で且つじてアシンセターせが欠組した機生物に、シチジン生産能を有する機生物の全DNAライブラリーを導入し、シチジンを生資に要求しなくなることを目印にコロニーを選択し、そのコロニーよりDNAライブラリーを回収する方法。
- (2) シチジン生産能を有する関生物のCTPシンセターせを被製し、そのアミノ酸配列の一部より

を竭み込む。このとも、目的遺伝子が染色体あたり複数個組み込めれば、C T P シンセターせ遺伝子をそのまま組み込んでも良い。

CTPシンセターゼ退伝子の改良としては、同 酵素は増地中のシチジンによって調酬をうけるこ とから、遺伝子プロモーターを構成的な(いつも 発現している)ものに置換すること、或いは同業 素はCTPによるフィードバック風音をうけるこ とから同弊素のプロステック部位をコードしてい る部分に変異を入れ、CTP非感受性の練案を追 成すること等が挙げられる。

このようにして押られた組換え体を含む概生物のうち、性質の安定した株を選び、通常の微生物の培養と同様の方法で培養を行なう。即ち、度免をしては、炭素器、変素器、関の生育に必要な多種の無機塩類、アミノ整類、ビタミン類等が適宜。選択の上、それぞれ単独もしくは混合して用いられる。場地中にPHの変動が観察される場合、環域、炭軽カルシウム、水酸化ナトリウム、アンモニア水等を通宜添加する。また、培地中にウラシ

性定される退伝子のDNA配列をもつオリゴタク レオチドと相談性を示すものを、シチジン生産能 を有する微生物のDNAライブラリーより選択する方法。

(3) シチジン生産機を有する微生物の近線の微生物のCTPシンセターゼがクローニングされている場合、これと相様性を示すものを、シチジン生産機を有する効生物のDNAライブラリーより選択する方法。

このようにして得たCTPシンセターゼ遺伝子をそのまま、既いは改良を加えた後、シチジン実 業能を育する微生物中で落発現させる。その方法 としては、以下の方法を用いることができる。

- [1] 宿主・ベクテー系の復立した機生物では、 CTPシンセターゼ退伝子をこのベクターに組み 込む。このとさ、このベクターが高いコピー数を 持っていれば、同選任子をそのまま組み込んでも ほい。
- (2) 染色体に目的遺伝子を組み込む方法が確立した微生物では、染色体に直接CTPシンセターゼ

ル、クリジン、UMP等の化合物を多量に入れ、これをシチジンにサルベージ合成させる方法も有効である。培養温度は、20℃-48 ℃の範囲において、使用する機を物の成實でシチジンの著作量、副産物の抑制を与感に入れ、通道審折できる。培養時間としては、シチジンの著作量、副産物の生成量によって異なるが、通常1日~7日である。

培養物からシチジンを分離採取する方法は、次 限法、イオン交換制能による処理、或いは選集に よる抽出等の公知の方法を用いることができる 〔特階略51-135597 号公発参照〕。

医施朗

以下に支護例を挙げて、本発明を具体的に説明 する。

実施例1

(工程1)

パチルス・ナットウC~1 株 (微工研密研究 11055号) からの全DNAの抽出。

ショ糖医反母配通心法のかわりに10% PEG状態法を用いる以外は同村ちの方法(衛生物温任学

実験法。106 質共立出版社)によってバチルス・ ナットウロー 1 株の値は7gより3.13gの全DN Aを抽出複製した。

[工程2]

全DNAライブラリーの作製

工程上で得た全DNAに、前限酵菜Pat (を作用させ完全分解後、1%アガロースゲル電気泳動に供し、6~9kbの大きさに相関するゲル駅分より、電気溶出法によりDNA断片を回収した。この回収DNA2μx と、Pst 1で完全に開製させた600 ngのベクケーPUC18を混合し、14・DNAりガーゼで15℃、12時間反応させ、両DNAを結合させた。

この維持大体 D N A を CaC e 。を用いた形質症 快速 (モレマュラー・クローニング。349 質。 コールド・スプリング・ハーパー・ラボラトリー) により、エシュリヒア・コリMB65 (微工研題等第 8900号) に導入し、アンビシリン504 g/ m e を含むしープロス原天培地 [パクトトリプトン (ディフコ社製) 1 %、発伝エキス0.5 %、NaC e

パーンボイム うの方法により T. Skb のバチルス・ナット り由来の DNA 断片を含むプラスミド DNA を囲収した。このプラスミドを9amHI Dび Pvu Eで切断することにより得られるパチルス・ナットウ Cー L 由来の3. Dkb の断片をアガロース プル電気泳動権 Tus 包載し、パチルス・ズブチリス及びエシュリヒア・コリ用シャトルベクター PHY3caPLX (タカラ港連製)を3amHI D び Smallで切断した 4. 9kbのDNA 断片 200ng と混合し、 ToDNA リガー ぜで15℃、12時間反応させ、 両DNA リガー ぜで15℃、12時間反応させ、 両DNA リガー ぜで15℃、12時間反応させ、 両DNA リガー せで15℃、12時間反応させ、 コリル A を結合させた。この組接 大体 DNA を CaC & この組接 たいよりに アンピシンを含まない M9億地で 選択することにより、 目的の7. 9bb を有するプラスミドを得た。

このプラスミドpFS037は、JF61MのCTPシンセターゼ欠損を安定に相談することにより、パチルス・ナットウC~【由来のこの3.0kb 断片にCTPシンセターゼ遺伝子は含まれていると判明した。

0.5 %、寒天1.5 %) 上で生育してきた6800コロニーを 4 等分し提め、パーンポイムらの方法 (Nucleicacid Reserch, $\underline{\tau}$ 、1513 (1979)] によりプラスミドDNAを調製し、パチルス・ナットウモー1 の染色体ライブラリーとした。

(工程31

DNAライブラリーからCTPシンセターゼ・ クローンの選択・分離

工程 2 で将た換色体ライブラリー D N A を CaC 4 2 を用いた形質伝検法により、C T P シンセターゼを欠損したエシェリヒア・コリJF 618 【CGSC5566株:米国イエール大学、 E. Coligenetic stack center】に輝入し、アンピシリン 60 u g/ m 2 を含み。シチジンを含まない M 9 培地 (Nam HPO。6g/ 4、 KHaPO。3g/ 2、 NaC 2 0.5g/ 2、 HHaC 2 1g/ 3。2 a M Mg SO 4。 0、1 m M CaC 2 2 2 2 0 0 u g/ m 2 プロリン、 20 u g/ m 2 プロリン、 20 u g/ m 2 アルギニン、 2 u g/ m 2 テアミン、 2 0 u g/ m 2 アルギニン、 2 u g/ m 2 テアミン、 2 0 u g/ m 2 テルギニン、 1 c u g/ m 2 テフシル】で生育する株を選択し、前出の

[工程4]

パチルス・ナットウC~1由果CTPシンセターゼ遺伝子の塩基配列決定

同3.9kb のDNA斯片の程列をサンガー与の方法 [Proc Nat1. Aca4. Sci. U.S.A. 74. 5463 (1917)] により決定した(第2図)。 その結果、パチルス・ズブチリスのCTPシンセターゼと同一のアミノ酸をコードする部分が存在した。しかし、その塩基配列はパチルス・ズブチリスのそれとは異なりその遺伝子略号の使用採使は第1歳に示す通りパテルス・ナットゥC-L関有のものであった。また、プロモーター領域、ターミネーター領域もこの株に固有のものであった。

(工程51

バチルス・ナットウCー!由来のCTPシンセ ターゼ油伝子をブローブとした染色体 DNAとの サザンハイブリダイゼーション

制限酵素 Dra I 及び Acc I で切り出したパチルス・ナットウCTPシンセターゼをコードする全域を含む1.8kb の D N A 新片 (第2回参照) をブ

ローブ (プローブエ) として、パチルス・ナット ウローミの染色体を Pat I. Kind町で切断した DNAとサザンハイブリダイゼーションを行なっ た。その結果、 Pst 1 切断の1.6kb、Hind回切断の 0.5kb の予想された位置にパンドを生じた。ま た、終上コドンの40bp下流の AccI 記録部位より 下度の\$40bp のDNA断片(第2図参照)をプロ ープ(プローブ目)とした場合には Pat I 断片の 1.5kb の予想された位置にパンドを生じた。この ことから今回のクローニングした3.0kb の断片が バチルス・ナットウC-I由来であることが確か められた。一方、同英味をパチルス・ズブチリ ス165 株(米国オハイオ大学、Baciltus Genetic stack center laik) の染色体を用いて行なっ た。プローブ【を用いたところ、Hind可切断の0. 5kb の予想された位置にパンドを生じたがプロー プリでは、 Pszl、MindO、EccRIのいずれで切 断したDNAにも、パンドが検出されなかった。 [1報6]

プラスミドpF\$037のパチルス・ナットウC-1

ラサイクリン20gg/mgを含むSEED液体増地 【グルコース 2 % 、 NaC # 0.25%、ポリペプトン (和光純菜) 1%、イースト・エヤス 53 (和光 接葉】 1 %、ピオチン100 u g/ m 4 、ウラシル 100 μg/ me 、PH7.3] 50 meに1白金耳線曲し、 37℃18時間培養する。この培養液5 mgより集団 し、2 mをのホモジネートバッファー(トリス~ 塩酸20mH/PN8. d) EDTA1mH、ATPLAN、メルカプトエ タノール 20ml (グルタミン2ml) に感濁後、水 中、超音波処理を施し、酸体水モジネートを得 る。これを帯量の2×反応パッファー(トリスー 塩酸 50mM (PHS. 0)、MgC B 2 25mM、 UTP10mM。 ATP 8 aM. GTPlaw、グルタミン20mM、EDTAloN)と混合し、 37℃5分間加温後、3分間環準して反応を停止さ せる。この反応線をMPLC分析(ワットマンSAX-id ・25 カラム、0.4川ソン間~2.5%アセトニトリルバ ッファー (PH3 3) 、読差毎分1.5m2、被長291mm で検出】し、生成したCTPを定量し、1分間に 14モルのCTPを生成する活性を Liunitと定義 \$ 6.

への無入

エシェリとア・コリpFSO37/JF618よりパーンボイムちの方法により抽出した15g。のpFSO37を山根らのプロトプラストを削いる方法(違伝子工学、P173、共立出版、1987年)でパチルス・ナットウロー1体に導入し、20g8/g2のテトラサイクリン配性となったコロニーを43神た。パーンボイムらの方法で、5コロニーのプラスミドを抽出し、BankI およびEcokI で切断し、アガロースゲルで洗動パターンを見たが、いずれもpPSO37と同一のパターンであった。

これら5 コロニーのうちの1 つを、パチルス・ナットウ C - 1 (pFS087) として、平成2年1月29日付で、通商産業省工業技術院教生物工業技術研究所に、海工研覧専業(1211 号(f±8M P-1)21)の資産番号で考託してある。

(工程で)

pFSO37を持つパチルス・ナットウC~1のCT Pシンセターゼ結性

- pFS037を持つパチルス・ナットウローLをテト

その結果、pFSO37を持つパチルス・ナットウC ~ 1 はホモジネートタンパク1mg 当たり $1t8_6$ × $10^{-1}mnits$ であるのに対し、ベクターであるpHY 360PLKのみを持つパチルス・ナットウC <math>-1 は、 $16.5 \times 10^{-1}mnits$ であった。

このようにして、約30コピーのブラスミドpHY 300PLK上にCTPシンセターゼ 遺伝子 を組込み、パチルス・ナットウロー1 に導入することにより、10倍以上のCTPシンセターゼ活性の上昇が复認された。

(工物名)

pFS037を持ったパチルス・ナットウロー1を用いたシチジン生産

pFS037を持つパチルス・ナットウC - 1 をナトラサイクリン20μg/ m 2 を含む SEED 確体培地で、37で18時間迫鉄後、チトラサイクリン20μg/ m 2 を含むシチンン生産培地 【グルコース 10%、CaCO。1 %、イーストエキス D 3 (和光純菜) 0.5%、KH2PO。 D.8%、(MK、),SO。0.4 %、(NH*)*CO 0.4%、ビオチン100 ng/ m 2、|pH7.2)】50 m 4 に 2

形接種し、 500 e 4 写 フラスコ中、37℃3日間培養したところ、0.24 es/ n 4 のシチジンが養殖されていることが確認された。

なお、対照として工程(に記載のバデルス・ナットウC = 1をテトラサイクリンを含まない以外は同じ条件で指摘したところ、シチジンの蓄積量は0.10 mg/ = をであった。

実炼例 2

実施例 L で得られた pF S037を持つパチルス・ナット クロー 1 を、培養液にウラシル 2 ms / m をを含む以外は支施例 1 の条件で培養したところ、塩他中のシチジン芸術量は8.41mg / m & であった。

対照としてバチルス・ナットウロー1をチトラサイクリンを含まないこと以外は上記と同じ条件で培養したところ、増進中のシチジン蓄積量は 0.12mg/m4であった。

<u>参考例 1</u>

pFS017を持つエシェリヒア・コリJF618 のCT Pシンセターゼ活性

実施例 1 で何た pF\$037を持つエシュリヒア・コ

リJF618 をアンピシリンSeus / a4を含むしープロス液体培地 100 m4に l 白金耳橋関し、37で、16時間培養する。この培養液 100 m2より集態し、あとはバチルス デナットウロー1の例と同様にロエアシンセターゼ活性を測定する。その結果、pFS037/JF618はホモジネートタンパク l m2当たり103 × 10⁻¹units であるのに対し、pNY300pl & のみを持つエシェリヒア・コリJF618 は、3.7×10⁻¹units であった。このようにバチルス・ナットウロー1 ロエアシンセターゼ遺伝子は、要種生物中での富発現も可能である。

以下余白

無し長 (その1)

35フーナミノ駆	使用賴收	
	バタかん ラッシウ	K##1-27#91
I [] · Phe	E (1 12%)	511,1251
TTC-Ph+	14 (2.61%)	14 (2.61%)
TT3-Lau	1 (0.56%)	3 (0.56%)
TTG·Leu	3 (1, 68%) T	3 ,40%}
GFT-Leu	18 (5.545)	20(3.13%)
CTC-Leu	5 (0. 93%)	4 (0.75%)
CTA·Lea	140 1931	1 (0.) 9 %)
CTG-Lew	7 (1.31%)	1(1,31%)
477-11e	19 (3 : 54%)	19 (5.54%)
ATC-11e	22 (4. 181)	22 [4.10%)
AT5-114	9 (0.40%)	0(0.48%)
ATG-Wet	10(1 47%)	10(1-27%)
CTT-Yal	1112.4381	14 (2. 61%)
GTC-Va)	9 (1), 46%)	B(1,63%)
GT4-bai	12 (2. 24%)	11 (2.05%)
67G-Yal	11 (5.453)	11 (2, 05%)
TCT-See	7 (1.313)	7(1.31%)
TCC+Ser	140.183)	3 (0.55%)
TC4-Ser	8 (8 - 493)	# (1) . (9K)
TCO-Ser	0 (0.00%)	0 (0.00%)
CCT·Pro	0(1.403)	811.49%}
CCC-Pro	0 (0.00%)	D (0.00%)
CCA-Pre	4 (0.15%)	410.16%)
CCG-Pro	11(2.05=)	1112.05%
ACT-The	2 (0.37%)	₹ (0.57%)
ACC-Thr	2 (0,375)	2 (4. 37%)
4CA-The	7013,7556	20 (3 133)
ACG-The	1 (1.31%)	7 (8.31%)
GCT-AIW	7 (1.313)	T (8.3151
GCC-41a	1 (0. 931	[(D. 1987
GCA - Ala	0 () . 49%1	0 (k. 49%)
GCG - Alm	13 (2.43%)	13 (2. 43%)

H . H (JA)

第1章 (その2)		
	任用頻度	
167-7(/雌	###1-P#\$7	4942-25992
TAT-Tet	611.12%	6 (6 . L2 X 2
TAC-TFF	1412.61%]	14(2.41%)
TAL- + # *	140.19%1	1 (9.19%)
TAG-++4	\$10.0 0%]	9 (4. 30%]
CAT-HEB	3 (0.56%)	3 (0.56%)
CAC-Nim	9 (. 4 5)	9 (1.685)
CAA-Gta	10(1,67%)	30(1,07%)
CAG-GL4	(0(L.67%)	1011.475)
AAT-ASA	4(0.76%)	4(0,75%)
TVC-Y20	16 (3.26%)	16 (3, 342)
ARR-Lys	29 (5, 41%)	24 (5, 414)
AAG-Lye	E (1, (1%)	4 (1.495)
GAT-Amp	16 (2.98%)	16(2,99%)
GAC-ASP	15 (2.04%)	15 (2. #0%)
GAA-Giu	32 (S. 9TE)	32 (5. 97%)
646-510	14(2.61%)	14 (2. 61%)
TET-Cys	5 (0.56%)	\$ (0.56%)
TGC-Cys	4 (0.15%)	4 (8. 75%)
TGA-++4	4 (4 . 4 0 %)	0 (0.00%)
166-179	3 (0.54K)	3 (0 56%)
£61-111	611.1231	641.1281
CGC-AFE	13 (2, 43%)	13 (2.435)
CEN-FIE	[(d , 19%)	[(0.19X)
CGG-414	910.00x1	0 (0 . 05%)
AGT-Ser	440.00	0 (4.00%)
MEC-Ser	8(1.49%)	8 (1.49%)
AGR-AFE	3 (0.56%)	3 (4.54%)
155-106	446.40%1	4(4.40%)
GGY-GLY	7(1.315)	4(1.12%)
GGC-Gly	1913.5451	19 (3.54%)
GGA-GLY	14(2.41%)	14(2.615)
666-61y	5 (0.13%)	6(1,12%)
生コドン数	536	576

(発明の効果の展要)

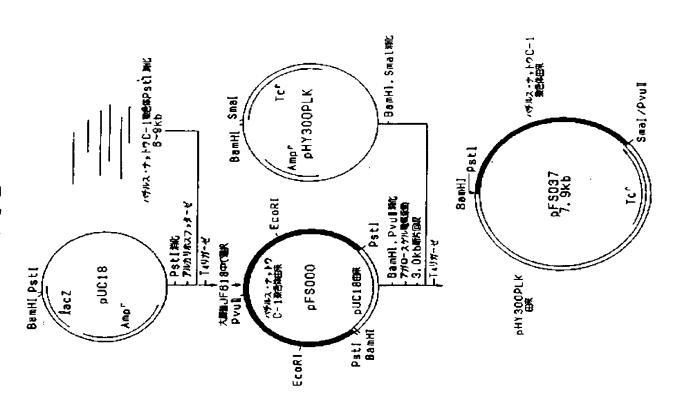
本発明によると、CTPシンセターゼ遺伝子を含む組換え体 DNAで形質転換された微生物を用いることによって、シチジンの生産性が顕著に上昇する。また、暗響液中にウラシル系化合物を入れた場合、ピリミジンサルベージ系譜により、シチジン系化合物の質質量がさらに増加する。

4.図面の簡単な説明

第1回は、バチルス・ナットウC-1由来の CTPシンセターゼ遺伝子を含むプラスミドッFS 037 構築の蝦噶図である。

第2 図は、パチルス・チットウ C - 1 由果の C T P シンセターゼ連伝子の塩蓄配列を示す。





⊠

i

第2区

CHICLEGAIT EGGTATGATE ARCTTGATER AGRAMETCAS COSACACTON AGGOSIANAN GANANAGOS ABERRAGONE TERRASAGON TOTTO-SETT SACONCETTE ANDRESSED ECONOCIONE CATENTECE ARRESTED ARRESTED FOR CONTRACT CONTRACT TORCONFORM CARCETEGACA **SECONCON CONTETTIONS NETGONGRAD ATATTOTTON TORNORINGS CHARGADORG ARPTHADATA GRATCHORIT SCHRETTICAL AMERATCHTO CONTRACTOR PERSONALS PERSONALS EXPRESSED ASSASSABLE ASSASSABLE TENDINGS TENDINGS DEPOSITOR DESCRIPTION TOTISTED CACCOTTEST THIRDIATA ASPEATITE ASSOCIATAS CATTITUDE ASSAURANT ARTISTS AND TOTAGETAS ACCORDINGS OF THE TOTAGETAS ACCORDING ASSOCIATED ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ASSOCIATION ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ACCORDING ASSOCIATION ACCORDING ACCORD #3000 THE BANGET BANGET ATTENDED TOGATCEAR CATCHICATE SANCAGER CARGESCE CTACCAGER GRACETAE TOGATCEAR CATCHICATE TOGATCHICATE TO "C. CORRECCT SPACECECE POCACCITOS TEACTATEM CETITIATES ACRITIAGET GARACARETE ACCAROCTEA CAROAGOIA AFTETATICA ACCOMETTA ANNANCANCO COCCOCAGAN TACCTTOGAG GRACCOTACA GGECRÍNDOCO CREATERCAN REGARITHAN AGACGATOTT TACCOCGGAG CHIEGOC ANACCOMENT STEETCHTE CHEMANICE CONTROTOR CONTROTOR ANTCHORDE ANTCHORD STREETCH BANTONING CONTINUEDO COMMANDO TANNOTHER CLASTETHE CECUTAL ACCULTANCE TREFORDED A TRANSPARA ACCEPTACE CONFIGURATION SECTION OF THE PARTICULAR AND STORES AND AND ARRESTS OF THE PROPERTY AND ADDITIONAL ADDITIONAL PROPERTY OF THE JOINGHIMO APRACEDGYY ATICALISES ARCATECOGN CANCETTING TEGATTERIGG EDGAGETTER PALACAREG ETTERTAREC TTGFFFGEG SCHOLITSKA TIESCATOCH ANGALGOGGA MITGTECGAN TERMININGE THEITANCHA RETCHERAR CHATCHARM CONFINGAN COCCCTISTO COCALLY NO TTOMOGRACE TO ACCEPTAC AITTETETTS TOGASTETCY RESELATED COCTARGOT TOGASAGE TOTALAGES AMSTGOATCH ACCCCGNAGA AGRICANIAGAN MACRATATICS CAGNACTERS MASSECGNACA GAGGGCATEN TRETGESTOR EGGATTEGEN GAGGGGORTG TECHNOGEN EXICATION ACHIANTING COCCORRIAN CARCAPTECT TECTIONS TO TECTION CAIGS-NOTE CONFETATE ANTHORISE RANCOTATES CONTINUATIO OCCUPANTE ACCEQUARTY DESCRESCAS CHERATACES ESTERATERS ESSESSES ANDERSANDE TOTALISMAN CICCOGGGA - EXTECTION OF THE CONTROL CONTROL TO A CONTROL CONTRO PRINTING MATGARTYCA GARAGEMANT GRAMBAGEM BECPTCOTOF TETCHOOGOG MAGGECTONT GRACOTOTT TTORACTEMAN SACS, FOCTY COTTOGRADE TYETCHETYE CATCENGACT PERFOTCHAD ACCORDANCE COTCACCOTE FATTGARAGE CITTATEGRA OCCITATEC ASPERTAD TORASOSCRO BOSECTRASER RESTROOTER RARRITISCAS SOCRETICAL DEFENDANT BERGRESS EFFECRACE E'SHEELE'S -TAL-ISSOUR PREGATARIE ACTICAGEREE TOTTTTEEPT CORCOCCER RESOURCET TARRESCES GEGRAGAS GERATIATIT RESOCCECE STREATHER TRANSPORCE CTATCERES CTCC+TOCOG AGGACGGATT TTGRAGGCAG CACESTITON ACCISTACAC GARTICAGE ACCESTATCE CHITAGOTOC CTGGEATGES TERCHARES ESCRECUTES ECCENTATES SATORCECES CONTENSES STEEDSCAFE CALUNCASES GARGESTES ATCATABLE ACCREATEST GCCGATTERS CAPTERCADE CUTTERATOR EXAMENTED ATTACRATES OFFRANCE ACCRECATE ACCRECATES PIN-OCCION TENCHENTE ATGMENOREM TEMPERICEM GEOGRAPHATE COMMANDO OFFICETATES SEGMENAMO CONFECESSO SOCIOCESSO ECOSCITATE CONTINUE ANACESATES SECTIATED TRATAPORAS CONTATTION CONTATION TO TO THE ANACESATE SECTION OF THE PROPERTY OF THE PR